Institut für Sozialmedizin und Epidemiologie
des Bundesgesundheitsamtes
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Hans Hoffmeister

Die Polyacrylamidelektrophorese

Methodik und Einsatzmöglichkeiten in der Differentialdiagnose der Lungenerkrankungen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Schütt, Klaus-Hermann

Neumünster

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547206_0033

Institut für Sozialmedizin und Epidemiologie
des Bundesgesundheitsamtes
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Hans Hoffmeister

Die Polyacrylamidelektrophorese

Methodik und Einsatzmöglichkeiten in der Differentialdiagnose der Lungenerkrankungen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Schütt, Klaus-Hermann

Neumünster

Referent: Professor Dr.H. Hoffmeister

Korreferent: Professor Dr. H.-J. Dulce

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12.Juni 1975

Die Polyacrylamidelektrophorese

Methodik und Einsatzmöglichkeiten in der Differentialdiagnose der Lungenerkrankungen

1. Einleitung

Zum Beweis von Dysproteinämien hat die Elektrophorese auf Papier- und Celluloseacetatträgern längst ihren Stammplatz in der medizinischen Labortechnik. Obwohl man mit dieser Methode 5 Serumproteingruppen unterscheiden kann, werden im allgemeinen nur zwei dieser Gruppen bewertet: das Albumin bei Proteinverlusten und die Immunglobuline bei entzündlichen Prozessen oder Lebererkrankungen. Die übrigen Fraktionen stehen in ihrer Aussagekraft hinter den erstgenannten zurück. Diese Tatsache wird verständlich, wenn man die Heterogenität der restlichen Fraktionen bedenkt.

Bereits 1959 führten Raymond, Weintraub, Ornstein und Davis (1,2,3,4,5) das Polyacrylamid als Trägermaterial in die Elektrophorese ein. Das Polyacrylamidgel stellt ein Maschennetz mit konstanter Porenweite dar, das als Molekülsieb wirkt. Bei der Wanderung im elektrischen Feld wird ein Proteingemisch sowohl nach Ladung als auch nach Molekülgröße getrennt. Mit dieser Technik gelingt es, alpha- und beta-Globuline in mehr als 20 Einzelfraktionen aufzulösen.

Der Nutzung dieser überlegenen Methode in der Labordiagnostik standen Schwierigkeiten bei der Interpretation der Serumpherogramme entgegen. In der Tat beeinflussen die methodischen Variablen wie Acrylamidkonzentration, Quervernetzungsgrad, Puffersysteme und Gellänge die Ergebnisse, so daß diese nicht ohne weiteres miteinander zu vergleichen sind.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die Methode zu standardisieren, den speziellen Problemen der Serumdiagnostik anzupassen und die Frage zu prüfen, ob die erhöhte Trennleistung bei Lungenerkrankungen zu diagnostisch verwertbaren Aussagen führt. Um die klinischen Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde der methodische Teil im Rahmen einer Arbeitsgruppe gelöst.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Die Versuchsreihe zur Anpassung der Methode an die Probleme der Serumdiagnostik wurden in einem Gerät der Firma Pleuger ausgeführt: Acrylophor, Elektrophoresekammer nach dem Bloemendalprinzip.

Änderungen der Methodik machten eine neue Konstruktion notwendig. Dieses nach unseren Angaben gebaute Gerät ist unter dem Handelsnamen Kophorese bei der Firma Biomol, E. Barth, Ilvesheim erhältlich. Zur Pherogrammauswertung benutzten wir Photometer mit Pherogrammzusatz und Kompensationsschreiber der Firma Eppendorf Gerätebau, Hamburg.

2.2. Chemikalien

Acrylamid-reinst, NN Methylenbisacrylamid-reinst und Dimethylaminopropionitril-reinst waren Handelspräparate der Firma Serva, Heidelberg. Kaliumferrizyanid und Ammoniumpersulfat in Analysenqualität wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

Als Puffersubstanzen wurden Trishydroxyäthylaminomethan p.a. und Glycin p.a. der Firma Merck, Darmstadt verwendet. Die Proteinfarbstoffe Amidoschwarz 10B rein, Procion Brilliant Blau-RN rein, Coomassie Brilliant Blau RS rein bezogen wir bei Serva, Heidelberg.

2.3. Serumproben

Die Serumproben wurden von der Blutbank des Universitätskrankenhauses Eppendorf, der 1. Medizinischen Klinik des Universitätskrankenhauses und dem LVA-Krankenhaus Hamburg-Großhansdorf zur Verfügung gestellt.

War eine Weiterverarbeitung der Proben nicht innerhalb von 6 Stunden nach Abnahme möglich, wurden die Proben bei -25°C eingefroren.

2.4.1. Beschreibung des Systems

Zur Trennung dienten 75 mm lange Gelzylinder eines 7,5 %igen Polyacrylamidgels, das sich aus zwei Teilgelen unterschiedlicher Porenweite zusammensetzte. Als Redoxkatalysator wurde das System Kaliumferrizyanid-Ammoniumpersulfat-Dimethylaminopropionitril verwendet. Das pH-Milieu in Gel und Elektrodenkammern wurde mit einem 0,045 m Trispuffer und einem 0,19 m Glycinpuffer pH 8,5 konstant gehalten.

Der Gießvorgang erfolgte in 80 mm langen kalibrierten Glasröhrchen mit plangeschliffenen Enden. Die Röhrchen trugen bei 35 und 75 mm jeweils eine Ringmarke, die die Länge der Teilsäulen markierte.

2.4.2. Herstellung der Stammlösungen

Tabelle 1 enthält die Vorschrift zur Herstellung der Stammlösungen. Zur Polymerisation der jeweiligen Säule wurden gleiche Volumenteile der Stammlösungen I bis IV, die den entsprechenden Index tragen, gemischt.

Die Lösungen waren vor Licht geschützt und bei einer Temperatur um +4°C 3 bis 4 Wochen haltbar. Eine zunehmende Polymerisationszeit bei gleicher Temperatur zeigte den Verfall der Lösungen an.

2.5. Herstellung der Polyacrylamidgele

2.5.1. Vorbereitung der Kammer

Die Glasröhrchen wurden gründlich mit einem Spülmittel (RBS^{R}, Extran^{R}) mechanisch gereinigt. Die Spülmittelreste ließen sich durch spülen mit Leitungswasser, destilliertem Wasser und Aceton entfernen. Die Spülung mit Aceton bot den Vorteil des schnellen Trocknens der Röhrchen im heißen Luftstrom.

Die untere Öffnung des Röhrchens wurde mit Parafilm^{R} verschlossen. Hierzu wurden die Löcher der unteren Führungsleiste der Kathodenkammer mit einem schmalen Streifen Parafilm in doppelter Lage bedeckt und anschließend die noch warmen Röhrchen durch die Löcher beider Führungsleisten bis auf den Boden der Kammer gedrückt.

T A B E L L E 1

I ES	30,0 g	Acrylamid	I WS	30,0 g	Acrylamid
	1,6 g	Bis		0,8 g	Bis
	100,0 ml	aq.bidest.		100,0 ml	aq.bidest.
II ES	1,6 g	DMAPN	II WS	0,8 g	DMAPN
	60,0 ml	Pufferstammlsg.		60,0 ml	Pufferstlsg.
	40,0 ml	aq.bidest.		40,0 ml	aq.bidest.

III (ES,WS)	30 mg	Kaliumferricyanid
	100 ml	aq.bidest.
IV (ES,WS)	480 mg	Ammoniumperoxodisulfat
	100 ml	aq.bidest.

Abkürzungen:	Bis	= N,N'-Methylen-bis-acrylamid
	DMAPN	= Dimethylaminopropionitril
	ES	= engmaschige Säule
	WS	= weitmaschige Säule

Pufferstammlösung	14,4 g	Glycin
	5,5 g	Trishydroxymethyl-aminomethan
	100,0 ml	aq.bidest.
Kammerpuffer	1 : 10	Verdünnung der Stammlösung

Zum Gießen wurde die Kathodenkammer auf einen Nivelliertisch oder eine andere hinreichend plane Unterlage gestellt.

2.5.2. Gießvorgang

Kalte Stammlösungen wurden zunächst auf Zimmertemperatur erwärmt. Je 3,5 ml der Stammlösungen I_{ES}, II_{ES}, III und IV im Verhältnis 1:1:1:1 gemischt, ergaben den Polymerisationsansatz für 12 engmaschige Gelsäulen. Die Röhrchen wurden mit diesem Gemisch sehr gleichmäßig bis zur unteren Ringmarke gefüllt. Um Luftblasen beim Einfüllen zu vermeiden, verwendeten wir 20 ml-Einmalspritzen (Braun, Melsungen) mit Kanülen der Größe 1 oder 2. Die Kanüle wurde so tief wie möglich an die Innenwand des Röhrchens gesetzt und die Flüssigkeit langsam aus der Spritze gedrückt. Die Spitze der Kanüle folgte dabei dem steigenden Flüssigkeitsspiegel bis zur Ringmarke. Anschließend wurde die Gelsäule mit wenig gasfreiem aqua bidest. überschichtet. Zur Überschichtung dienten 10 ml-Glasspritzen mit langer Planschliffkanüle. Dazu wurde die Kanüle an den Rand der Gelflüssigkeit gesetzt. Bei exakter Überschichtung zeigte die Gelflüssigkeit eine ebene Oberfläche, die für einige Minuten durch veränderte Lichtbrechnung an der Grenzfläche sichtbar blieb.

Nach ca. 30 Minuten trat 2 mm tiefer eine neue Grenzschicht zwischen auspolymerisiertem Gel und dem Überstand auf. Der Überstand wurde abgegossen und die Geloberfläche anschließend mit Elektrodenpuffer gespült. Vor dem Gießen der weitmaschigen Säule wurden die durch Adhäsion verbliebenen Flüssigkeitsreste durch Absaugen mit der Planschliffkanüle entfernt. Die Geloberfläche durfte bei dieser Manipulation nicht verletzt werden.

Das Polymerisationsgemisch für die weitmaschige Säule setzte sich aus je 4 ml der Stammlösungen I_{ES}, II_{WS}, III und IV zusammen. Die Flüssigkeit wurde bis zur zweiten Ringmarke aufgefüllt und mit aqua bidest. überschichtet. Das Gel polymerisierte nach ca. 60 Minuten.

Um das Gel bis zum Beginn der Elektrophorese vor Austrocknung zu schützen, wurde bei der oberen Säule der Spülpuffer belassen. Der Parafilm wurde ebenfalls erst kurz vor der Elektrophorese entfernt. Die Röhrchen wurden anschließend wieder bis auf den Boden des Nivelliertisches gedrückt.

2.5.3. Elektrophorese

Beide Kammern des Gerätes wurden mit der Verdünnung 1:10 des Tris-Glycinpuffers gefüllt. Der Puffer in der Kathodenkammer enthielt 20 µl einer alkoholischen Bromphenolblau-Lösung.

Die hohe spezifische Dichte des Serums erlaubte ein Unterschichten mit der Probe. Diese lag als schmale Zone zwischen Geloberfläche und Elektrodenpuffer. Nach Einschalten des Stromes wurde die Spannung für die ersten 30 Min. auf 60 V begrenzt. Anschließend wurde die Spannung auf 100 V erhöht. War die Kapazität der Kammer nicht voll ausgelastet, galt als Richtwert die Stromstärke von 1,2 mA pro Gel.

2.5.3.1. Probenvolumina

Das Probenvolumen richtete sich nach dem verwendeten Farbstoff. Bei der Routinefärbung mit Amido-Schwarz betrug das Probenvolumen 5 µl, bei der Procionfärbung 10 µl.

2.5.3.2. Technik des Auftragens von Proben

Ähnlich wie beim Überschichten der Gele mit aqua bidest. erforderte das Unterschichten des Serums ein gleichmäßig langsames Ausfließen der Probe. Wir bevorzugten Marburg-Pipetten der Firma Eppendorf-Gerätebau, Hamburg.

2.5.3.3. Probenvolumina mit geringem Proteingehalt

Zur Auftrennung von Liquor, Urin u.a. wurden längere Röhrchen verwendet, die höhere Probenvolumina aufnehmen konnten. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit einem 0,5 m Phosphatpuffer pH 7 in 20 %iger Sucrose versetzt.

2.5.3.4. Endpunkt der Elektrophorese

Die Dauer der Elektrophorese betrug ca. 3 1/2 Stunden. Der genaue Endpunkt war erreicht, wenn die Bromphenolblau-Bande sich 5 mm vor dem unteren Gelende befand.

2.6. Fixation, Färbung und Entfärbung

2.6.1. Die Amido-Schwarz-Färbung

Um das Gel aus dem Röhrchen zu entfernen, wurde es mit der Planschliffkanüle unter Führung der Glaswand vorsichtig mit Wasser umspült. Die Färbung erfolgte in einer Lösung von 5 %igem Amido-Schwarz in 7,5 %iger Essigsäure, in der die Gele 15 Minuten verbleiben. Danach wurde das Gel kurz unter fließendem Wasser gespült. Die Entfärbung erfolgte über 48 Stunden in 150 ml 7,5 %iger Essigsäure pro Gel unter dreimaligem Badwechsel.

2.6.2. Färbung mit Procion und Coomassie

Bei nachfolgender Querentfärbetechnik erfolgte die Färbung mit einer 5 %igen Lösung von Procion in 7,5 %iger Essigsäure. Die Färbedauer betrug 2 Stunden. Coomassie erwies sich als der färbeintensivste Farbstoff. Er wurde wie Procion gehandhabt.

2.6.3. Die Querentfärbung

Nach der Elektrophorese wurden die Gele zunächst in 12 %iger Trichloressigsäure fixiert und anschließend ca. eine Stunde gewässert. Zur eigentlichen Querentfärbung wurden dann die Gele so in die Gelkammer des Gerätes gelegt, daß sie nicht mit den Längsstreben in Berührung kamen. Durch Ausgießen der Kammer mit 1 %igem Agar in 1 mM Ammoniumsulfat-Lösung wurde diese Lage fixiert. Die Elektrodenkammern wurden mit einer 1 mM Ammoniumsulfatlösung gefüllt und die Gelkammer eingesetzt.

Der Betrieb der Kammer erforderte ein Netzgerät mit einer Mindeststromabgabe von 500 mA. Bei Spannungen zwischen 100 und 150 V war die Entfärbung nach 2 1/2 bis 3 Stunden abgeschlossen.

2.7. Photometrie

Die Gele wurden in optisch einwandfreie Glasröhrchen von 8 mm lichter Weite und 9 mm Außendurchmesser aufgesaugt und im Gelhalter fixiert. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 546 nm und einer Spaltbreite von 0,25x6 mm.

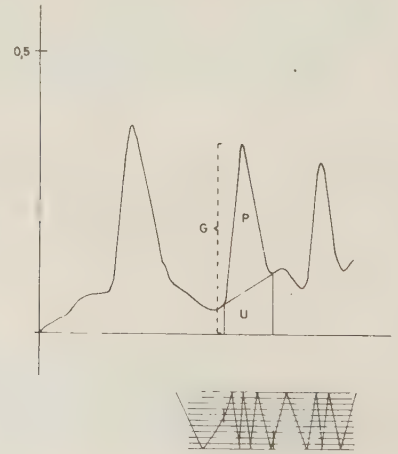
Der Nullpunkt wurde auf ein weitmaschiges Leergel bezogen, das nach Vorschrift gefärbt und entfärbt wurde. Lag kein Zerfall des β_{1C}-Globulins vor, konnte der Nullpunkt auf die Stelle mit der geringsten Extinktion im Gel bezogen werden. Sie lag im Minimum, das dem Transferrinpeak folgte.

2.8. Auswertung der Pherogramme

Die meisten Gipfel des Pherogramms lagen einem mehr oder weniger ausgeprägtem Untergrund auf und waren mit dem Integrationsschreiber nicht zu erfassen. Deshalb wurden die Minima eines bestimmten Gipfels verbunden und die so entstandene Fläche berechnet. Die Berechnung der Gipfelfläche kann nach zwei Methoden erfolgen:

a) Die Fläche wird planimetrisch aus dem Mittel mehrerer Messungen bestimmt. Bei dieser Methode hängt die Genauigkeit der Messung sehr von der Übung des Untersuchers ab.

b) Von den Minima fällt man das Lot auf die Nullinie und zählt die Integratoreinheiten zwischen beiden Schnittpunkten aus. Minimaverbindung, Nullinie und Lote schließen eine einfache geometrische Figur (Trapez oder Rechteck) ein. Zieht man diese Fläche, nach Umrechnung in Integratorflächeneinheiten, von den Integratoreinheiten der Gesamtfläche ab, erhält man die gewünschte Gipfelfläche. Abb. 1 verdeutlicht den Rechenvorgang an einem Pherogrammausschnitt



3. Ergebnisse

3.1. Vergleich diskontinuierlicher und kontinuierlicher Systeme bei Serumelektrophoresen

Die hohe Trennleistung der Polyacrylamidelektrophorese ist durch mehrere Faktoren bedingt: Bei der Polymerisation des Acrylamids und des Quervernetzers NN-Methylenbisacrylamid entsteht ein Gel mit definierter durchschnittlicher Porengröße, die stets reproduzierbar ist. Verändert man die Konzentration dieser Substanzen, so kann man die Porengröße in weiten Grenzen variieren. (2,5,8,9) Die Molekülstruktur des Gels besitzt im Gegensatz zu Celluloseacetat oder Papier wenig Eigenladung und bindet kaum Wasser Damit entfallen Fehlerquellen wie Adsorption und Elektroosmose. (2) Die Ausgangssubstanzen können in höchsten Reinheitsgraden gewonnen werden, womit die Voraussetzung für die Messung im UV-Anteil des Spektrums gegeben ist. Im Hinblick auf die Puffersysteme finden sich in der Literatur zwei unterschiedliche Verfahren.

Im diskontinuierlichen System (2,3,5,12,13) wird die Proteinlösung in einem weitmaschigem Sammelgel, welches dem Trenngel aufgesetzt ist, konzentriert. Dabei ist der Konzentrierungsschritt unabhängig vom Ausgangsvolumen der Probe. (2) Das Sammelgel enthält bei neutralem bis leicht saurem pH-Wert Anionen mit großer Beweglichkeit, die sogenannten Leitionen. Der pH des Elektrodenpuffers ist um ca. zwei pH-Stufen basischer und enthält langsamere Anionen, die Folgeionen.

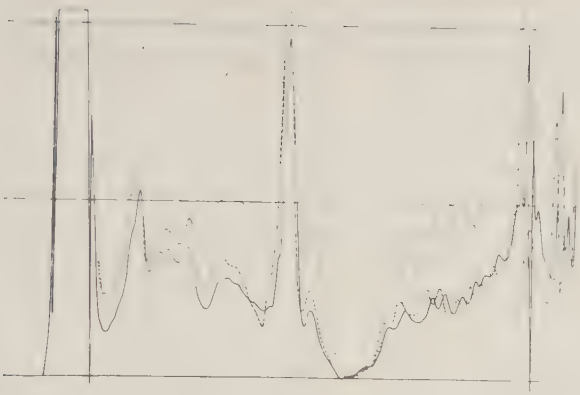
Legt man ein elektrisches Feld an, so entsteht zwischen Leit- und Folgeionen ein Bereich sehr hoher Feldstärke, in dem die Proteine - bewegt durch ihre Eigenladung - zu dünnen Scheiben konzentriert werden. Der pH-Wert des Trenngels ist so gewählt, daß die Folgeionen hier an Beweglichkeit gewinnen und die Proteine schnell überholen. Die eigentliche Trennung erfolgt dann im einheitlichen pH-Milieu. (10)

Neben dem Trenn- und Sammelgel wird häufig noch ein Probegel verwendet, das die Proteinlösung beim Start gegen eine Verdünnung durch den Elektrodenpuffer schützen soll.

Das kontinuierliche System (1,8,9,14,15,16,17,18,19) kennt nur ein Gel mit einheitlichem Puffer in den Elektrodenräumen und der Trennsäule. Raymond wies darauf hin, daß dieses System keine schlechteren Trennleistungen ergibt. (3,9,11) Wir haben Ergebnisse der diskontinuierlichen Elektrophorese mit unseren kontinuierlichen Elektrophoresen verglichen und qualitativ keine Unterschiede gefunden. (3,5,21,22,23,24)

Weil der technisch einfachere Ablauf für einen Routinebetrieb vorteilhafter ist, haben wir uns für das kontinuierliche System entschieden. Diese Leistungsgleichheit beider Systeme gilt jedoch nur für native Serumproben, da diese schnelle Anionen wie Chloride, Phosphate und Carbonate bei fast neutralem pH enthalten. Im Bereich der unterschichteten Serumprobe liegen somit ähnliche Verhältnisse wie im Sammelgel des diskontinuierlichen Systems vor, es fehlt nur der Konvektionsschutz durch die Gelstruktur. Niedrige Anfangsspannung und vorgekühlter Puffer tragen im kontinuierlichem System mit gleichem Erfolg zu ihrer Verhinderung bei.

Um den Einfluß des Ionenmilieus experimentell zu demonstrieren, wurden 20 ml eines Poolserums dialysiert und anschließend lyophylisiert. Gleiche Mengen des Trockenserums wurden dann jeweils in gleichen Volumina aqua dest., eines Tris-Glycin-Puffers pH 8,6 und eines 0,2 m Tris-HCL-Puffers pH 7,2 zu einer Endkonzentration von 7,5 g% gelöst und unter gleichen Bedingungen der Elektrophorese unterworfen. Den Tris-HCL-Puffer betrachteten wir hierbei als vereinfachtes Modell für die Ionenverhältnisse im Serum. Abb. 2 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Die Pherogramme wurden im Pausverfahren übereinanderprojiziert. Die Überlegenheit des Tris-HCL-Puffers erkennt man besonders deutlich im Postalbuminbereich. Diese Versuchsanordnung zeigt, daß diskontinuierliche Puffersysteme und Antikonvektionsgel zu einer guten Serumelektrophorese keinen wesentlichen Beitrag liefern.

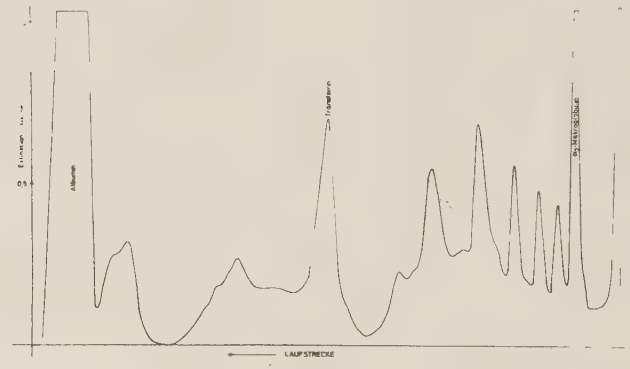


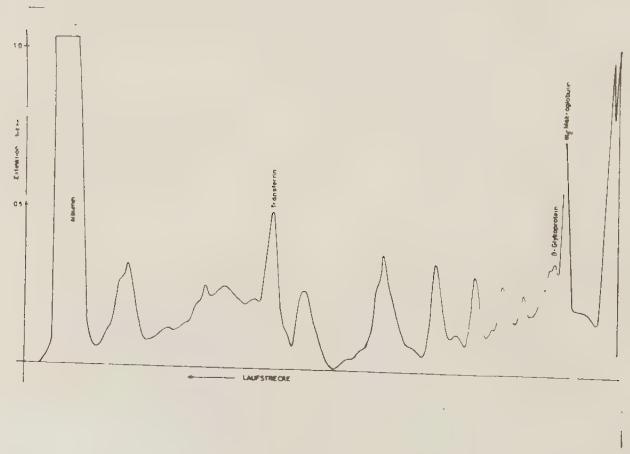
3.2. Methodische Modifikation

Erste Versuche zur Trennung von Normalseren wurden nach der Methode von Bloemendahl in einer Plaugerelektrophoresekammer durchgeführt. (15,16,17,18,19) Bei diesem System fiel auf, daß die Trennleistung im anodennahen Bereich zwischen Albumin und Transferrin wesentlich schlechter als im kathodennahen Anteil des Spektrums war. Offenbar trägt der Gelsiebeffekt in dem oben angesprochenen Bereich nicht mehr zur Trennleistung bei. Hinzu kommt, daß ein Mißverhältnis zwischen Molekül- und Porengröße die Diffusion begünstigt.

Die Porengröße des Gels kann man sowohl durch die Acrylamid- als auch durch Quervernetzerkonzentration verändern. Ornstein (2) und Davis (3) haben dem Quervernetzer zwar nur stabilisierende Wirkung auf das Gel zugeschrieben, sein Einfluß auf die Porengröße ist jedoch durch die Untersuchungen von Jokand, Wisse und Bloemendahl gesichert. (15) Durch die Verdoppelung des Quervernetzers im unteren Gelanteil ließ sich die Auftrennung im Postalbuminbereich soweit verbessern, daß eine eindeutige Gc-Typendiagnostik

möglich wurde, was bisher nur mit immunologischen Methoden bei wesentlich größerem Aufwand und geringerer Sicherheit erreicht werden konnte. (20)





Weitere Veränderungen wurden mit dem Ziel vorgenommen, den methodischen Fehler so gering wie möglich zu halten. Um ein gleichmäßiges Feld innerhalb des Gels zu erhalten, verwenden wir kalibrierte Röhrchen mit plangeschliffenen Enden. Verschließt man die Röhrchen, wie bisher üblich, beim Gießen durch Eindrücken in Plastilinmasse, so entsteht eine Grenzfläche, die ebenfalls zu Feldlinienverziehungen führt. Albumin und einige Postalbuminbanden sind dann stets schüsselförmig deformiert, was zu erheblichen Fehlern bei der photometrischen Auswertung führt. Verschließt man die Röhrchen mit straff gespanntem Parafilm, wird diese Fehlerquelle vermieden. Ein ähnlicher Fehler entsteht immer dann, wenn bei der Elektrophorese die Feldlinie nicht parallel zur Längsachse des Gels verläuft. Die Elektrophoreseapparatur sollte so beschaffen sein, daß eine entsprechende Fixierung möglich ist.

Die Geldicke wird im wesentlichen durch die Lichtstärke und die dadurch limitierte Spaltbreite des Photometers bestimmt. Zur Auswertung stand uns ein Eppendorf-Photometer mit Pherogrammzusatz zur Verfügung. Bei der Verwendung des serienmäßigen 6 mm x 0,25 mm Spaltes erzielten wir eine ausreichende Lichtausbeute. Wir wählten eine Gellänge von 7,5 cm, wobei alle sichtbaren Banden gut registriert wurden.

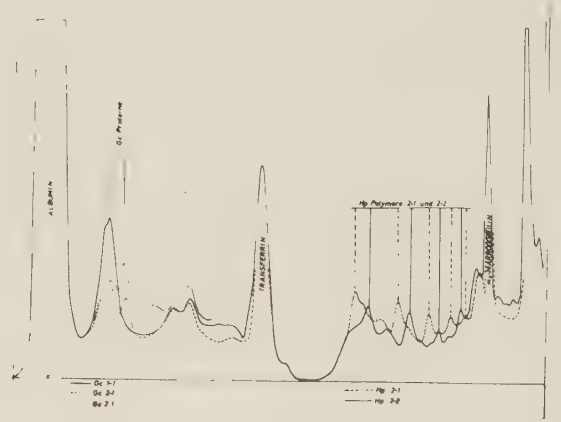
4. Untersuchungen an Normalseren

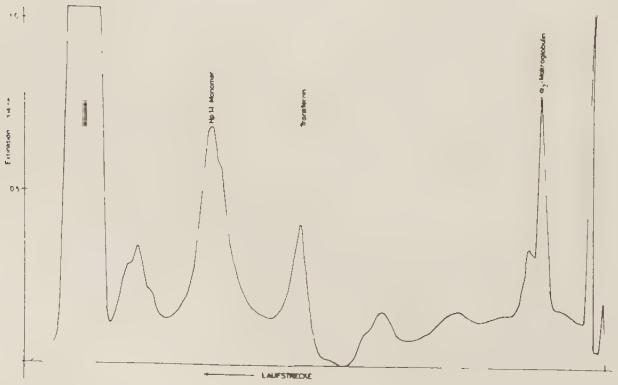
4.1. Das Pherogrammbild des Normalserums

Während bei der Celluloseacetat-oder Papierelektrophorese stets fünf Fraktionen nachweisbar sind, müssen bei der Polyacrylamidelektrophorese sechs genetisch bedingte Proteinmuster unterschieden werden. Neben der Zugehörigkeit zu einem bestimmten Haptoglobintyp (Hp 1-1, Hp 2-2 oder dem Mischtyp Hp 2-1) (25) lassen sich auch die gruppenspezifischen Komponenten (Gc 1-1, Gc 2-2 und Gc 2-1) (20) nachweisen. Dieser methodische Vorteil ist besonders für forensische Problemstellungen von Bedeutung. Bisher mußte die Haptoglobintypendiagnose durch eine Stärkegelelektrophorese mit anschließender Peroxidase (25) gesichert werden.

Die Gc-Typenbestimmung erfolgte in einem gesonderten, methodisch sehr aufwendigen Verfahren. (20)

In den Abbildungen 4a und 4b sind die verschiedenen genetischen Hp- und Gc-Typen einander gegenübergestellt. Die Identitätsnachweise für die Einzelfraktionen wurden mit einer modifizierten Immundiffusionstechnik geführt. Methodik und Ergebnisse dieses Verfahrens finden sich in der Promotionsschrift von K. Abraham. (6)





Zur Auffindung der Proteine im Pherogramm sind die absoluten Laufstrecken kein ausreichendes Charakteristikum. Selbst bei genauer Einhaltung von Temperatur und Trennzeit können die Laufstrecken um etwa 1 mm schwanken, was bei der dichten Bandenfolge bereits zu Verwechslungen führt. Da die Bandenfolge innerhalb eines genetischen Typs stets gleich bleibt, hat auch der weniger Geübte kaum Schwierigkeiten bei der Erkennung der Einzelfraktionen. In allen sechs genetischen Typen lassen sich das Albumin am anodennahen Ende des Gels, das Transferrin in der Mitte des Gels und das alpha$_2$-Makroglobulin am kathodennahen Ende des Gels als markante Banden auch bei pathologischen Seren leicht erkennen. An der kathodischen Grenzfläche des Gels, kaum eingewandert, liegt das ß-Lipoprotein. Dem Albumin schließt sich kathodenwärts das Gc-Protein an, dessen drei Pherogrammmuster in Abb. 4a wiedergegeben sind. Zum Transferrin hin folgen Inter alpha$_1$-Trypsininhibitor, alpha$_1$-Antichymotrypsin, Hämopexin, alpha$_1$-Lipoprotein und Coeruloplasmin. Diese Fraktionen sind bei Normalseren nicht sehr scharf voneinander abgesetzt und nur bei höheren Konzentrationen als deutlich abgesetzte Peaks sichtbar. Hämopexin und Coeruloplasmin werden beim Hp 1-1-Typ von diesem Protein überdeckt. Im Gegensatz zu Hp 2-2- und 2-1-Typen bildet der Hp 1-1-Typ keine Polymere. Die Typendiagnose ist hier also besonders einfach aus dem Fehlen der Polymerbanden im Posttransferrinbereich zu diagnostizieren.

Der Bereich kathodenwärts vom Transferrin ist beim Hp 2-2- und Hp 2-1-Typ von den Polymeren dieses Proteins geprägt. Beide Typen unterscheiden sich durch die Wanderungsgeschwindigkeit ihrer Polymere in Bezug auf das alpha$_2$-Makroglobulin oder das ß$_1$C-Globulin. Bedingt durch schwerere alpha-Ketten im Hp 2-2-Typ (26) wandern die Polymere dieses Typs etwas langsamer als die entsprechenden Polymere des Hp 2-1-Typs. Daher findet man beim Hp 2-1-Typ zwischen ß$_1$C-Globulin und alpha$_2$-Makroglobulin fünf Banden, während beim Hp 2-2-Typ in diesem Bereich nur vier Polymere vorkommen.

In Abb. 4a sind die Posttransferrinbereiche beider Typen übereinander projiziert.

Als weiteres Kriterium kann man die Wanderungsstrecken des jeweilig ersten Polymers mit der Lage des β_1C-Globulins vergleichen. Das Hp 2-1 Polymer sitzt dem β_1C-Globulin auf, während das entsprechende Hp 2-2 Polymer diesen Proteinpeak freiläßt. Parker und Bearn (27) haben für die Diagnose des Hp 2-2-Typs 1963 den Nachweis von Polymerbanden im Bereich zwischen alpha$_2$-Makroglobulin und ß-Lipoprotein gefordert. Nach unseren Erfahrungen sind diese Banden bei normalen und subnormalen Konzentrationen selten sicher zu bestimmen. Bei sehr niedrigen Haptoglobinkonzentrationen werden auch die oben beschriebenen Kriterien fragwürdig. Hier hilft dann nur der Umweg über eine Hämoglobinbeladung mit anschließender Peroxydasereaktion. (28)

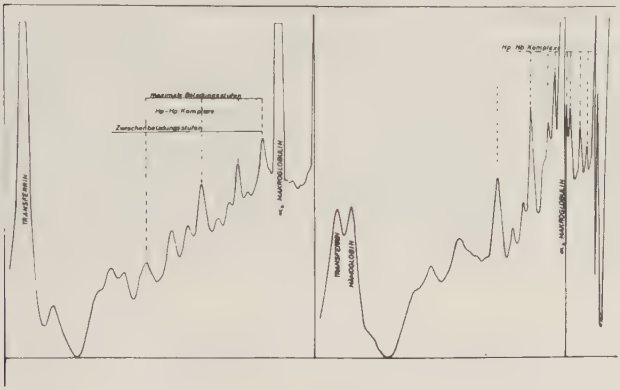
Wie aus den abgebildeten Pherogrammen ersichtlich, sind alle bisher beschriebenen Fraktionen des Posttransferrinbereichs einem mehr oder weniger ausgeprägten Proteinuntergrund aufgelagert. Fehlen die Hp-Polymerfraktionen z.B. beim Hp 1-1-Typ oder einer Ahaptoglobinämie, erkennt man im Untergrund deutlich drei breitgipflige Maxima. (Abb. 4a) Das erste stellt das oben erwähnte β_1C-Globulin dar, während der übrige Kurvenverlauf durch die Konzentrationen der Immunglobulinklassen A und G bestimmt wird. Der zweite Gipfel wird vornehmlich vom IgA bestimmt, bis zum Gelende folgt dann der Hauptanteil des IgG. Die planimetrisch bestimmbare Fläche unter den Maxima kann zur semiquantitativen Bestimmung von IgA und IgG herangezogen werden, was die Aussagefähigkeit der PAA-Elektrophorese bereichert.

4.2. Abweichungen von typischen Pherogrammen

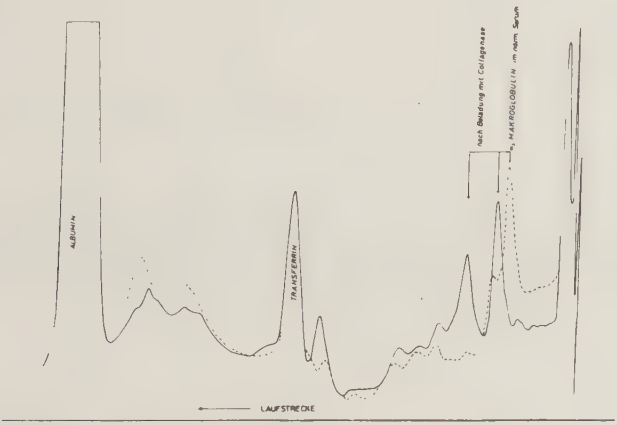
Abweichungen von den oben beschriebenen typischen Pherogrammen finden sich in folgenden Ausnahmen:

a) Zur Auftrennung gelangt ein hämolytisches Serum. Je nach Hämolysegrad können neben freiem Hämoglobin - bei starker Hämolyse - noch bis zu zwei Zwischenbeladungs-

stufen der Haptoglobine bei schwacher Hämolyse auftreten. Abbildung 5 zeigt Pherogramme bei verschiedenen Graden der Hämolyse. Der Hämoglobin-Haptoglobinkomplex hat eine wesentlich höhere Peroxydaseaktivität als das freie Hämoglobin. (28) Auf die methodische Nutzung bei der Hp-Typenbestimmung wurde oben hingewiesen.



b) Bestimmte Enzyme haben eine hohe Affinität zum alpha$_2$-Makroglobulin. In einigen Fällen konnte eine Inhibitorfunktion des Proteins nachgewiesen werden. (29)



Gestützt auf die Erfahrungen mit dem elektrophoretischen Verhalten des Haptoglobin-Hämoglobinkomplexes erwarteten wir eine Wanderungsverzögerung. Wie Abb. 6 zeigt, erfolgt jedoch neben einer Aufspaltung dieser Fraktion eine Zunahme der elektrophoretischen Beweglichkeit.

4.3. Eichkurve, methodischer Fehler, Normalwerte

Die Eichkurven für die Farbstoffe Amido Schwarz 10B und Procion Brilliant Blue wurden an Hand der Bezugsproteine Albumin und Transferrin, beides Handelspräparate der Behring-Werke, aufgestellt. Die Einzelwerte sind Ergebnis einer Verdünnungsreihe mit physiologischer Kochsalzlösung. Im angegebenen Meßbereich von 0-100 Mikrogramm verläuft die Farbstoffbindungskurve linear. Mit Ausnahme des Albumins können alle Fraktionen normaler und pathologischer Seren in diesem Bereich gemessen werden.

Beide Farbstoffe enthalten von Charge zu Charge wechselnde Mengen an Verunreinigungen, die die Steilheit der Geraden beeinflussen können. Bei Verwendung neuer Chargen muß die Gültigkeit der Eichkurve überprüft werden.

Eine quantitative Auswertung der Elektrophoresebanden ist nur sinnvoll,wenn der methodische Fehler wesentlich kleiner als die biologische Streuung bei Normalpersonen ist.Um diese Frage zu beantworten,haben wir die Standardabweichung des methodischen Mittelwertes - ermittelt aus 31 Einzelelektrophoresen des gleichen Serums - mit der Standardabweichung des Normalwertes der entsprechenden Fraktion - ermittelt aus 312 Seren von Blutspendern - verglichen. Der Quotient aus den Quadraten der Standardabweichungen (F-Test) beantwortet die Frage, ob die Einzelwerte beider Messungen der gleichen Grundgesamtheit angehören. Wie Tab. 2 zeigt, gehören beide Wertegruppen verschiedenen Grundgesamtheiten an, womit die oben beschriebene Bedingung erfüllt ist.

Protein	Methodischer Fehler			Biologische Streuung			F-Test
	n	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	
Gc-Protein	31	15,81	0,79	120	16,65	3,70	22,00 (2,26)
Transferrin	31	23,53	1,38	312	22,21	2,16	2,46 (1,99)
alpha - 2 Makroglobulin	31	57,89	0,30	312	52,56	1,49	24,70 (1,99)

Die eingeklammerten Zahlen der F-Testspalte geben die obere Signifikanzschranke für p=0,001 an.

Um die quantitativen Veränderungen pathologischer Seren erfassen zu können,wurde die Pherogrammbande der wichtigsten Fraktionen von 312 Blutspenderseren berechnet. (Tab. 3)

TABELLE 3

	n	$\tilde{x}$	s	V	$\pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$
		($\cdot 10^{-8}$g)	($\cdot 10^{-8}$g)	(%)	($\cdot 10^{-8}$g)
Albumin	60	47830,3	923,38	1,93	233,61
Oc 1-1	120	1665,0	370,32	22,24	66,30
Transferrin	312	2221,0	216,36	9,70	23,80
β-Glykoprotein	312	427,8	95,20	22,20	10,56
α_2-Makroglobulin	312	522,6	149,00	28,50	16,50
γ-Globulin gesamt	312	4104,6	1043,90	25,40	115,80
Hp 1-1	33	1599,2	458,00	28,00	160,30
Posttransferrin I	33	114,4	37,20	32,00	13,00
Posttransferrin II	33	630,8	143,30	22,00	50,10
Hp 2-1 a	147	126,4	48,40	38,00	7,80
Hp 2-1 b	147	118,7	28,20	24,00	4,50
Hp 2-1 c	147	73,8	18,80	25,50	3,00
Hp 2-1 d	147	39,8	18,10	47,00	2,90
Hp 2-1 e	147	12,5	9,00	71,00	1,30
Posttransferrin I	147	197,0	50,70	25,50	8,10
Posttransferrin II	147	272,2	65,80	24,00	10,50
Hp 2-2 a	132	143,9	44,10	30,60	7,50
Hp 2-2 b	132	148,3	42,00	28,20	7,10
Hp 2-2 c	132	99,9	27,50	27,50	4,70
Hp 2-2 d	132	66,6	22,40	33,60	3,80
Posttransferrin I	132	85,4	31,10	36,40	5,30
Posttransferrin II	132	363,9	149,10	40,90	25,30

5.1. Untersuchungen an entzündlichen und malignen Erkrankungen der Lunge

Die Globulinfraktionen des menschlichen Serums sind von verschiedenen Autoren mit der Zielsetzung untersucht worden, ein Kriterium für Malignität zu finden. (22,35,36) Im allgemeinen werden dabei Seren maligner Tumoren verschiedener Organe, Histologien und Stadien verglichen mit einem Kollektiv von Normalseren. Nur selten findet man das Tumorkollektiv aufgeschlüsselt, wobei dann die einzelnen Tumorarten nur sehr gering vertreten sind. (35) Eine statistisch signifikante Korrelation des malignen Wachstums zur Konzentration konnte jedoch von keinem der Autoren bestätigt werden.

Wir haben in der vorliegenden Arbeit die Fragestellung daher bewußt auf eine bestimmte diagnostische Fragestellung eingeengt. Sie lautet: sind Bronchialcarzinome einerseits von Normalwerten, andererseits von den vielfältigen entzündlichen Veränderungen der Lunge und des Bronchialsystems zu unterscheiden?

Die Zusammensetzung des Kollektivs entzündlicher Erkrankungen erfolgte zufällig und war vom klinischen Alltag bestimmt. Die Zahl banaler Lungenaffektionen, wie leichte hypostatische Bronchopneumonien, wurden allerdings absichtlich gering gehalten, da für diese Erkrankung andere pathophysiologische Momente bestimmend sind. Weiter enthält dieses Kollektiv eine größere Anzahl von Lungentuberkulosen und Morbus Boeck. Pleuraschwarten, alte Lungeninfarkte, Atelektasen und Lungencysten fanden keine Berücksichtigung, da sich die Pherogramme bei diesen Lungenbefunden nicht von den Pherogrammen der Normalseren unterscheiden. Den 61 Fällen entzündlicher Erkrankungen stand ein Kollektiv von 71 Bronchialcarzinomen gegenüber. Im Untersuchungszeitraum bot keiner dieser Patienten einen Anhalt für eine die regionären Lymphknoten überschreitende Metastasierung. Folgt man der TNM-Einteilung der Tumorstadien, so kann die überwiegende Zahl der Fälle den Gruppen $T_1N_1M_0$, $T_2N_1M_0$ und $T_2N_2M_0$ zugeordnet werden. Die Diagnose war in der Mehrzahl der Fälle durch bronchioskopisch gewonnenes Biopsiematerial gesichert.

Auf eine Unterteilung des Kollektivs Bronchialcarzinome haben wir verzichtet, da sowohl die verschiedenen TNM-Gruppierungen als auch die histologisch verschiedenen Formen eine uniforme Antwort im Pherogramm ergaben. Drei Fälle dieses Kollektivs verdienen jedoch eine besondere Erwähnung. Diese Bronchialcarzinome waren zufällig in einem sehr frühen Stadium entdeckt worden und konnten einer operativen Therapie zugeführt werden. Weder der intraoperative noch der pathologisch-anatomische Befund des Präparates zeigten einen Befall der regionären Lymphknoten. Da der Tumor die Segmentgrenzen nicht infiltriert hatte, konnten diese Fälle mit einiger Sicherheit dem Tumorstadium $T_1N_0M_0$ zugeordnet werden. Bei diesen Tumorstadien war eine entsprechend geringe Antwort erwartet worden, die Pherogramme ließen sich jedoch zwanglos in das übrige Kollektiv einordnen.

Sollten sich diese Befunde an größeren Kollektiven bestätigen, wäre die einfache Untersuchung mit der Polyacrylamidelektrophorese ein wertvolles Instrument bei der Früherkennung des Bronchialcarzinoms.

5.2. Statistische Auswertung

In den Tab. 4 und 5 sind die Meß- und Rechenwerte der Kollektive Entzündungen und Bronchialcarzinome zusammengestellt. Im F-Test wurde die Vergleichbarkeit der Kollektive geprüft, zur Signifikanzüberprüfung wurde der T-Test herangezogen, wobei Normalverteilung der Kollektive angenommen wurde. (Tab. 4 u. 5)

5.2.1. Verteilung der genetischen Haptoglobintypen

Die prozentuale Verteilung der Haptoglobintypen in Normalseren ergab für den Hp 1-1-Typ 11 %, 47 % für den Hp 2-1-Typ und 42 % für den Hp 2-2-Typ. Diese Werte stimmen gut mit den Ergebnissen anderer Untersucher überein. (45)

T A B E L L E 4

F- und t-Test der wichtigsten Eiweißfraktionen bei normalen und entzündlichen Seren

	NORMALSEREN			ENTZÜNDUNGEN						
	N	$\bar{x}$	s	N	$\bar{x}$	s	F	t		
Hp 1-1	14	2,40	1,30	5	15,10	12,97	100,00	10,00	$S_N < S_E$	$\bar{x}_N < \bar{x}_E$
Transferrin	312	22,21	2,13	61	16,36	4,89	2,29	108,34	$S_N < S_E$	$\bar{x}_N < \bar{x}_E$
Posttransferrin	33	0,85	0,31	61	2,66	3,68	60,94	25,69	$S_N < S_E$	$\bar{x}_N < \bar{x}_E$
Hp 2-1 a	147	1,26	0,48	41	4,28	3,41	50,47	35,53	$S_N < S_E$	$\bar{x}_N < \bar{x}_E$
Hp 2-1 b	147	1,19	0,28	41	3,03	2,23	63,43	48,68	$S_N < S_E$	$\bar{x}_N < \bar{x}_E$
Hp 2-1 c	147	0,74	0,18	40	1,86	1,40	60,49	47,06	$S_N < S_E$	$\bar{x}_N < \bar{x}_E$
Hp 2-2 a	132	1,44	0,44	26	7,13	2,95	8,46	49,67	$S_N < S_E$	$\bar{x}_N < \bar{x}_E$
Hp 2-2 b	132	1,48	0,42	26	3,40	1,73	16,97	52,89	$S_N < S_E$	$\bar{x}_N < \bar{x}_E$
Hp 2-2 c	132	1,00	0,28	26	1,93	1,20	18,37	37,50	$S_N < S_E$	$\bar{x}_N < \bar{x}_E$
ß-Glykoprotein	312	4,27	0,95	30	2,04	0,93	1,04	64,45	$S_N = S_E$	$\bar{x}_N < \bar{x}_E$

TABELLE 5

Proteinfraktion		Entzündungen N	Entzündungen x̄	Entzündungen s	Karzinome N	Karzinome x̄	Karzinome s	F-Test	t-Test
Postalbumin[a] 4/5	G	5	24,68	13,66	16	34,59	11,53	1,4027	1,600
	U	5	9,66	2,88	16	13,42	3,85	1,788	1,9993
	P	5	15,10	12,97	16	21,40	10,07	1,6736	1,1010
Postalbumin[bc] 4/5	G	56	9,60	6,09	55	13,38	4,66	1,7059	3,6762
	U	56	6,44	4,71	55	7,69	4,28	1,2173	1,4671
	P	56	3,19	2,42	55	6,01	3,40	1,9753	5,0533
Transferrin		61	16,36	4,89	71	15,19	4,70	1,080	1,413
Posttransferrin		61	2,66	3,68	71	4,25	3,82	1,0787	2,449
Hp 2-1 I	G	30	7,78	5,01	41	12,48	4,46	1,2610	4,189
	U	30	3,56	2,44	41	5,41	2,24	1,193	3,304
	P	30	4,28	3,41	41	7,12	2,72	1,579	3,937
Z I		30	2,85	1,97	41	3,94	1,60	1,534	2,612
Hp 2-1 II	G	30	6,85	3,97	41	11,02	3,43	1,331	4,576
	U	30	3,81	2,23	41	6,35	2,41	1,1755	4,556
	P	30	3,03	2,23	41	4,75	1,77	1,580	3,644
Z II		30	3,45	1,81	41	4,76	1,51	1,450	3,339
Hp 2-1 III	G	30	5,94	3,02	40	9,39	2,71	1,246	5,031
	U	30	4,08	2,26	40	6,19	2,06	1,211	4,088
	P	30	1,86	1,40	40	3,23	1,15	1,490	4,526
Hp 2-2 I	G	26	7,94	3,25	15	13,06	3,67	1,2737	4,664
	U	26	4,99	2,28	15	7,37	2,36	1,0706	3,131
	P	26	2,95	1,28	15	5,68	1,74	1,8393	5,789
Z I		26	4,91	2,21	15	5,14	1,87	1,390	0,347
Hp 2-2 II	G	26	9,83	3,61	15	14,11	3,34	1,162	3,783
	U	26	6,53	2,41	15	7,16	2,14	1,268	0,845
	P	26	3,40	1,73	15	6,95	2,02	1,3586	6,169
Z II		26	4,48	1,61	15	3,82	1,57	1,053	1,286
Hp 2-2 III	G	26	8,17	1,99	15	11,28	2,86	2,0526	4,117
	U	26	6,24	1,33	15	6,65	2,18	2,3839	0,756
	P	26	1,93	1,20	15	4,65	1,50	1,5643	6,413
ß Glycoprotein[a]	G	5	10,88	2,55	17	10,84	1,95	1,7138	0,0379
	U	5	9,22	2,46	17	8,60	1,46	2,8274	0,7243
	P	5	1,66	0,60	17	2,25	1,14	3,5476	1,1016
ß Glycoprotein[b]	G	30	9,67	3,27	41	12,34	3,64	1,2334	3,205
	U	30	7,62	2,97	41	9,81	3,59	1,4653	2,742
	P	30	2,04	0,93	41	2,37	1,18	1,6111	1,280
ß Glycoprotein[c]	G	26	12,23	2,78	15	12,50	3,53	1,6114	0,1837
	U	26	10,12	2,35	15	8,56	2,93	1,5495	1,8605
	P	26	2,23	1,11	15	3,94	1,11	1,0069	4,7373
IGk[a]		30	14,45	4,59	17	12,01	3,13	2,1406	1,3798
IGk[b]		30	10,60	4,31	15	13,01	5,18	1,4424	2,085
IGk[c]		26	15,32	3,10	41	15,50	5,42	3,0548	0,1359

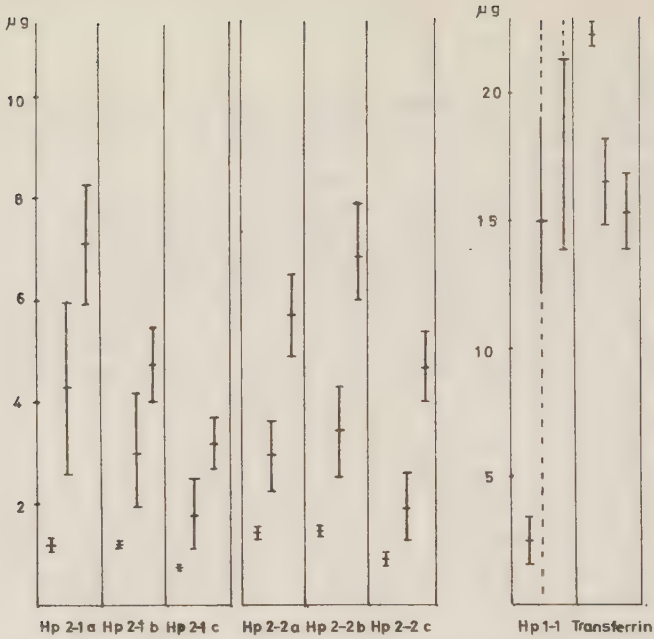
Für das Kollektiv der Entzündungen ergibt sich folgende Verteilung: Hp 1-1 8 %, Hp 2-1 49 % und Hp 2-2 43 %. Die geringe Verschiebung der prozentualen Verteilung gegenüber den Normalseren ist mit der kleineren Fallzahl von 61 gegenüber 312 untersuchten Normalseren leicht zu erklären. Im Kollektiv der Bronchialcarzinome tritt eine wesentlich stärkere Verschiebung in der prozentualen Verteilung auf, die sicher nicht mit einer zu geringen Fallzahl begründet werden kann. Auf 72 Bronchialcarzinome entfallen 22 % Hp 1-1-Typen, 57 % Hp 2-1-Typen und 21 % Hp 2-2-Typen.

Diese Parallelität zwischen dem Hp^1-Allel der Haptoglobine und der Bronchialcarzinommorbidität ist augenfällig und erinnert an ähnliche Befunde, die im ABO-System hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung von Magencarzinomen erhoben wurden. (36)

5.2.2. Bewertung der Einzelergebnisse

Bei der Auswertung wurden folgende Fraktionen berücksichtigt:

1) Die Postalbuminbande 4/5, die Hämopexin und Coeruloplasmin beinhaltet. Diese Fraktionen mußten zusammen ausgewertet werden, da die Auflösung der Elektrophorese und des Photometers in diesem Bereich ungenügend war. Bei den Hp-Polymertypen 2-1 und 2-2 ist der Gesamtpeak G bei den Carzinomen deutlich größer. Eine sichere Aussage ist jedoch nicht möglich, da sich die Vertrauensbereiche beider Kollektive überlappen. Bei Hp 1-1-Seren ist dieser Bereich vom Monomer des Haptoglobins geprägt.
2) Die graphische Darstellung der Vertrauensbereiche in Abb. 8 zeigt, daß Haptoglobin vom 1-1-Typ bei Entzündungen sehr unterschiedlich reagieren kann. Der Vertrauensbereich schließt die Vertrauensbereiche der anderen Kollektive ein; damit ist eine gesicherte Aussage bei diesem seltenen genetischen Typ unmöglich.



3) Bei den Hp-Polymertypen ist die differentialdiagnostische Aussage hingegen eindeutig. Mittelwerte und Vertrauensbereiche sind in allen Fällen deutlich voneinander abgesetzt. Der F-Test weist für die Kollektive der Entzündungen und Bronchialcarzinome stets die Zugehörigkeit zu gleichen Grundgesamtheiten aus, der T-Test bestätigt den signifikanten Unterschied zwischen beiden Kollektiven. Die Unterschiede sind mit einer für biologische Messungen sehr niedrigen Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,01 gesichert. Aus diesen Ergebnissen geht weiter hervor, daß es belanglos ist, welchen der drei Polymerpeaks man zur Beurteilung heranzieht.

4) Zwischen den einzelnen Polymerbanden des Haptoglobins sind noch schwache Banden zu identifizieren. Beim Hp 2-1-Typ decken sich diese Banden mit Polymerbanden des Hp 2-2-Typs. Theoretisch könnte die Synthese von Hp 2-2-Polymeren beim Hp 2-1-Typ möglich sein. Die statistische Auswertung stützt diese Vermutung. Die Zwischenbanden des Hp 2-1-Typs sind nur bei diesem Typ

bei Bronchialcarzinomen gegenüber den Entzündungen signifikant erhöht. (Tab. 4)

5) Die Bewertung des ß-Glykoproteins ist ähnlich problematisch wie die Auswertung des Postalbumins 4/5. Hp 1-1-Typen zeigten keinen Unterschied zwischen den Kollektiven, während bei den Polymertypen ein signifikanter Unterschied zu Tage tritt. Es liegt die Vermutung nahe, daß dieser Peak durch Hp-Polymere beeinflußt wird. In der Tat konnten wir bei der Isolierung der Hp-Polymere (37,38) nachweisen, daß sich dieser Peak aus mindestens drei Einzelfraktionen, von denen eines ein Hp-Polymer ist, zusammensetzt. Zur differentialdiagnostischen Aussage liefert auch dieser Peak keinen Beitrag.

6) Das Transferrin ergibt ebenfalls keine signifikante Aussage bei der Fragestellung Entzündung oder Carzinom. Mittelwerte und Vertrauensbereiche beider Kollektive liegen jedoch deutlich niedriger als entsprechende Werte bei den untersuchten Normalseren. In extremen Fällen fanden sich Transferrinwerte von weniger als 30 % der Normalwerte. Da jedoch mindestens ein Drittel der normalen Transferrinmenge zur Aufrechterhaltung des Serumeisenspiegels nötig ist, könnten diese extremen Transferrinverminderungen die causale Ursache von Tumoranämien sein.

7) Dem Transferrin folgt eine Fraktion, über deren Identität noch Unklarheit herrscht. Mit der bei der Besprechung des ß-Glykoproteins erwähnten Methode konnten wir zeigen, daß dieser Peak zumindest bei Hp 2-1-Seren zu den Haptoglobinen zu rechnen ist. Für die übrigen Hp-Typen steht eine Klärung noch aus. Bei den Normalseren ist dieser Peak, wenn überhaupt, nur sehr schwach ausgebildet. In Extremfällen kann er das Transferrin jedoch mengenmäßig übertreffen. Die statistische Auswertung der Proteinmengen dieser Fraktion zeigt eine deutliche Parallele zum Verhalten der Haptoglobine.

8) Bei der allgemeinen Beschreibung der Pherogramme wurde die Möglichkeit einer semiquantitativen Aussage über die Immunglobulinmenge angedeutet. Wir haben hier einmal den Untergrund der Haptoglobinpeaks und zum anderen den Bereich zwischen alpha$_2$-Makroglobulin und ß-Lipoprotein herangezogen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den gesamten IG-Fraktionen ergab sich nicht.

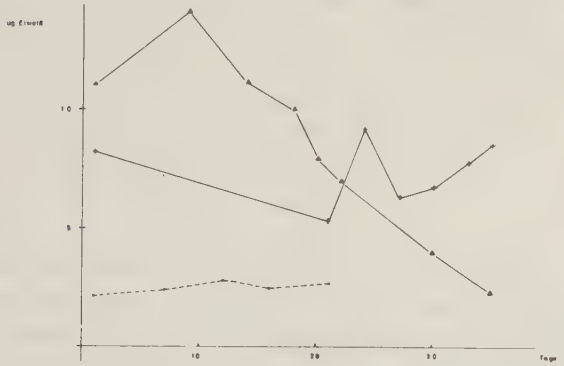
5.3. Falsch positive Ergebnisse

Haptoglobinspiegel, die im Vertrauensbereich von Bronchialcarzinomen liegen, haben wir im Kollektiv der Entzündungen nur in einem Fall gesehen. Bei einem 14jährigen Patienten war eine Lungentuberkulose durch eine exudative Pleuritis kompliziert. Da die anderen Tuberkulosefälle solche Haptoglobinvermehrungen nicht aufwiesen, nehmen wir an, daß diese excessive Hp-Vermehrung mit der exudativen Komponente der Erkrankung erklärt ist. Exudative Komplikationen bei anderen Lungenerkrankungen zeigten keine Hp-Erhöhungen, die über das im Kollektiv übliche Maß hinausgingen.

5.3.1. Verlaufskontrollen

Bei einigen Patienten beider Kollektive und bei einem freiwilligen Probanden mit Normalserum haben wir den Haptoglobinspiegel über 35 Tage bestimmt. Hierbei sollte geprüft werden, ob Therapieerfolg und Haptoglobinspiegel in Korrelation stehen und somit eine Therapiekontrolle möglich ist. Abb. 9 enthält die graphische Darstellung von zwei Fällen der beiden Erkrankungskollektive im Vergleich zu einer Normalperson. Als Beispiel für den Verlauf einer entzündlichen Erkrankung wählten wir die oben erwähnte Lungentuberkulose mit exudativer Pleuritis, da hier der Therapieerfolg besonders gut ablesbar war. Bei Bronchialcarzinomen ist der Erfolg einer kausalen Therapie (Radiatio oder Operation) schwierig zu kontrollieren, da die

Haptoglobinerhöhungen weit über den oben genannten Zeitraum persistierten. Für die Abbildung haben wir deswegen einen Fall ausgewählt, der unter sympthomatischer Therapie stand. Die Kurvenverläufe zeigen, daß bei den Entzündungen eine deutliche Korrelation zwischen der Therapie und dem Haptoglobinspiegel besteht, während beim Carzinom der Haptoglobinspiegel konstant erhöht ist und nur innerhalb der Grenzen des Vertrauensbereichs schwankt.

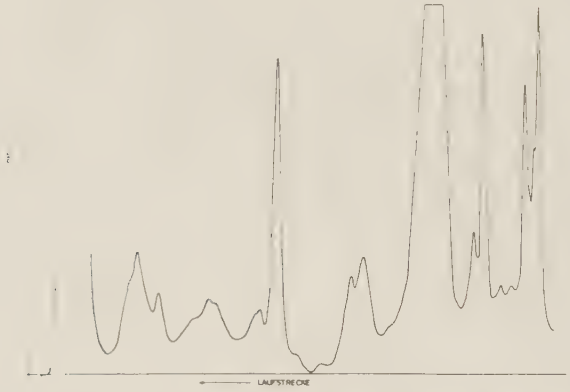


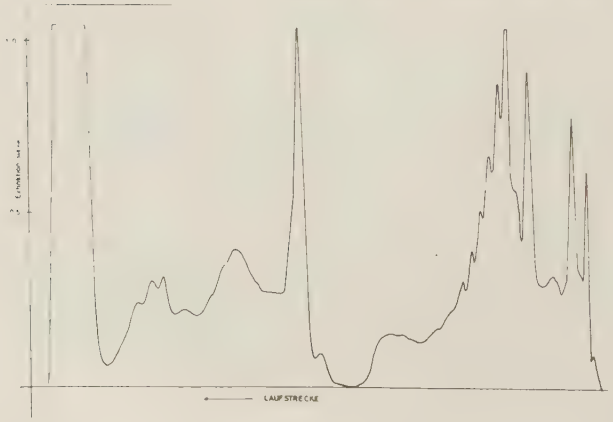
5.3.2. Diagnose von Paraproteinämien

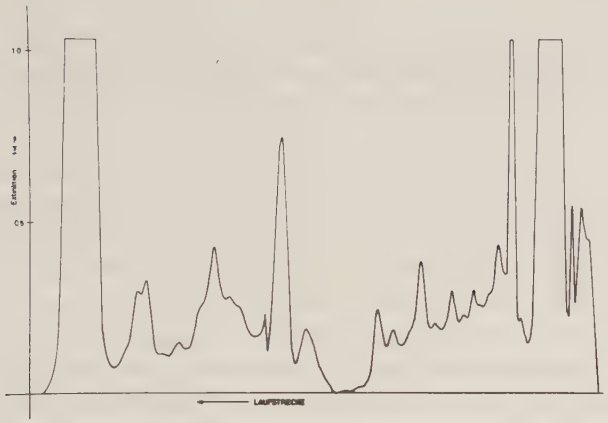
Die Polyacrylamidelektrophorese stellt ein Hilfsmittel bei der Diagnose von Plasmocytomen dar (13,39,40,41), das der Immunelektrophorese mindestens ebenbürtig ist. Zehn klinisch und immunologisch gesicherte Plasmocytome wurden mit der Polyacrylamidelektrophorese untersucht.

Bei IgA- und besonders IgG-Paraproteinämien zeigen sich häufig mehrgipflige Paraproteinbanden, die eine Zuordnung zum Typ der H-Kette erschweren können. Bei den IgA-Paraproteinämien ist dieses Phänomen durch 9S-11S usw. Aggregationen des IgA erklärt. Diese Aggregationen lassen sich durch Inkubation mit Cystamin rückgängig machen. (42)

Der Nachweis von IgM-Paraproteinen erfordert eine etwas veränderte Versuchsanordnung, da unter den beschriebenen Verhältnissen nur ein kleiner Anteil des IgM in das Gel einwandert. Ändert man jedoch die Richtung des Feldes durch einfaches Umpolen, findet man die IgM-Fraktion als sehr breitbasigen Peak am anodennahen Gelende. In diesem Bereich finden sich auch die entsprechenden Paraproteine. Ob die übrigen Paraproteinämien der Immunglobulinklassen D und E sowie Bence-Jones Paraproteine oder H-Kettenerkrankungen ebenso deutliche Bilder in der Elektrophorese ergeben, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.







Es ist bekannt, daß die Paraproteine die Synthese der normalen Immunglobuline hemmen. Die abgebildeten Pherogramme zeigen deutlich den geringen Untergrund im Posttransferrinbereich. Wie oben angedeutet, läßt die Polyacrylamidelektrophorese eine semiquantitative Beurteilung des Immunglobulinverlustes zu.

6. Diskussion

In ihrer streng standardisierten Form erlaubt die Polyacrylamidelektrophorese eine quantitative Beurteilung mehrerer wichtiger Serumproteine. Bei der Differentialdiagnose entzündlicher und maligner Erkrankungen erwies sich die Bestimmung von Haptoglobinen und Transferrin als besonders aussagekräftig. Eine methodische Alternative zur Bestimmung beider Proteine sind quantitative immunologische Bestimmungsverfahren. Aber gerade bei der Haptoglobinbestimmung wird die Überlegenheit der Elektrophorese auf Polyacrylamidträgern deutlich, da zur quantitativen immunologischen Bestimmung dieses Proteins, z.B. auf Partigenplatten, immer eine exakte Hp-Typenbestimmung gehört,

die wiederum nur auf elektrophoretischem Wege gelingt.

Die statistische Auswertung zeigte, daß die drei untersuchten Kollektive, Normalseren, entzündliche Erkrankungen und maligne Erkrankungen, sehr wohl voneinander unterschieden sind. Bemerkenswert war dabei die Uniformität der Haptoglobinreaktion in den verschiedensten Tumorstadien. Besonders die Reaktion bei Frühstadien des Bronchialkarzinoms berechtigen zu der Hoffnung, daß diese Methode wertvolle Dienste bei der Früherkennung leisten wird.

Von interessierten Klinikern erhielten wir oft Seren von Patienten, bei denen Malignitätsverdacht an anderen Organen als der Lunge bestand. Unter diesen Seren befanden sich mehrere Fälle von Magen- und Rectumkarzinomen. Ohne einer Untersuchung an statistisch aussagekräftigen Kollektiven vorzugreifen, können wir sagen, daß bei diesen Fällen keine uniforme Reaktion der Haptoglobine vorliegt. Hohe Werte kommen ebenso wie normale Haptoglobinspiegel vor. Möglicherweise haben Stadium und Histologie bei den übrigen Karzinomarten Einfluß auf den Haptoglobinspiegel, jedenfalls sind die Ergebnisse bei Lungenerkrankungen nicht ohne weiteres auf andere differentialdiagnostische Fragestellungen übertragbar. Andererseits sind mit den hier vorgelegten Ergebnissen über Lungentumoren aber auch die erwähnten Literaturergebnisse widerlegt worden, die Beziehungen zwischen Haptoglobinspiegel und maligner Erkrankung ganz allgemein verneinen.

Der Grund für die Fehlschlüsse dürfte darauf zurückzuführen sein, daß alle möglichen malignen Erkrankungen zu einem inhomogenen Kollektiv gemischt wurden.

Das Verhalten der Hp 1-1-Typen im Kollektiv der Bronchialkarzinome läßt sich mit der Behauptung einer erhöhten Morbidität dieses Typs nur unbefriedigend erklären. Eine zufällige Häufung von Hp 1-1-Typen im untersuchten Kollektiv

ist unwahrscheinlich, da Peacock bei der Untersuchung von Leukämien eine ähnliche Verteilung fand. (43) Sucht man nach alternativen Erklärungen, käme auch in Frage, daß Tumorprodukte die Polymerbildung unterdrücken und rückgängig machen. Somit entständen Pseudo-Hp 1-1-Typen.

Versuche, Hp-Polymertypen durch in vitro behandlung mit proteolytischen Enzymen in diesem Sinne zu verändern, ergaben zwar den Hp 1-1 Typen ähnelnde, aber deutlich unterscheidbare Pherogramme. Trotzdem erscheint uns diese Richtung der Erklärung fruchtbarer. Klein fand bei Untersuchungen an Leichenblut, daß hier der Hp 1-1 Typ mit 18% vertreten war. (44) Weiter konnten Murray und Robert zeigen, daß parenterale Gaben von proteolytischen Enzymen eine Erhöhung des Haptoglobinspiegels zur Folge hat. (45,46) Inwieweit die erwähnten Befunde als Modell für die Hp-Typenverteilung bei Bronchialkarzinomen dienen kann, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.
Es konnte gezeigt werden, daß die Polyacrylamidelektrophorese als differentialdiagnostisches Hilfsmittel einen hohen Stellenwert besitzt. Darüber hinaus dürfte die Methode in bestimmten Fällen der Therapiekontrolle sinnvoll einzusetzen sein. Im Abschnitt 5.3.1. wurde auf den raschen Abfall des Haptoglobinspiegels mit Einsetzen der Therapie bei der durch eine exudative Pleuritis komplizierte Tuberkulose hingewiesen. Der Kliniker wird sich in solchen Fällen vorzugsweise wohl auf andere, kausalere, allerdings auch langsamer reagierende Parameter verlassen.

Im Falle der Paraproteinämien besteht ein kausaler Zusammenhang. Das Paraprotein ist in der Polyacrylamidelektrophorese einer quantitativen Beurteilung zugänglich. Somit wird eine den entarteten Zellklon schädigende Therapie schnell und direkt meßbar.

7. Zusammenfassung

Es wird eine standardisierte Polyacrylamidgelelektrophorese beschrieben,die den Problemen der Serumdiagnostik angepaßt ist.
Das entwickelte Verfahren ist einfacher als die übliche Disk-Elektrophorese,dennoch ist die Trennschärfe der Disk-Elektrophorese mindestens gleichwertig,was durch konstruktive und methodische Verbesserungen erreicht wurde.
Eine Anwendung auch in kleineren klinisch-chemischen Laboratorien ist möglich.Bei strenger Einhaltung der aufgezeigten Standardbedingungen erwies sich die Methode als gut reproduzierbar.
An Hand von 312 Blutspendern wurden die Normalbereiche der wichtigsten Serumproteine bestimmt.
Im klinischen Teil der Arbeit wurde die differentialdiagnostische Aussage dieser Methode durch den Vergleich der Normalwerte mit je einem Kollektiv entzündlicher und maligner Erkrankungen der Lunge geprüft.Dabei zeigte sich, daß Haptoglobin und Transferrin besonders aussagekräftig sind.Weiterhin erwies sich die Methode als wertvolles diagnostisches Hilfsmittel zur Differenzierung von Paraproteinämien.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung
2.	Material und Methoden
2.1.	Geräte
2.2.	Chemikalien
2.3.	Serumproben
2.4.1.	Beschreibung des Systems
2.4.2.	Herstellung der Stammlösungen
2.5.	Herstellung der Polyacrylamidgele
2.5.1.	Vorbereitung der Kammer
2.5.2.	Gießvorgang
2.5.3.	Elektrophorese
2.5.3.1.	Probenvolumina
2.5.3.2.	Technik des Auftragens von Proben
2.5.3.3.	Probenvolumina mit geringem Proteingehalt
2.5.3.4.	Endpunkt der Elektrophorese
2.6.	Fixation, Färbung und Entfärbung
2.6.1.	Amido-Schwarz-Färbung
2.6.2.	Färbung mit Procion und Coomassie
2.6.3.	Querentfärbung
2.7.	Photometrie
2.8.	Auswertung der Pherogramme
3.	Ergebnisse
3.1.	Diskontinuierliche und kontinuierliche Systeme der Polyacrylamidelektrophorese
3.2.	Methodische Modifikationen
4.	Untersuchungen an Normalseren
4.1.	Das Pherogrammbild des Normalserums
4.2.	Abweichungen von typischen Pherogrammen
4.3.	Eichkurve, methodischer Fehler, Normalwerte
5.	Untersuchungen an entzündlichen und malignen Erkrankungen der Lunge

5.2. Statistische Auswertung
5.2.1. Verteilung der drei genetischen Haptoglobintypen
5.2.2. Bewertung der Einzelergebnisse
5.3. Falsch positive Ergebnisse
5.3.1. Verlaufskontrollen
5.3.2. Diagnose von Paraproteinämien
6. Diskussion
7. Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Text der Legenden

Verzeichnis der Tabellen und Text der Legenden

Literaturverzeichnis

1 Raymond, S. and Weintraub, L.
Acrylamide Gel as a Supporting Medium for Zone Electrophoresis
Sciece 130, 711 (1959)

2 Ornstein, L.
Disk Electrophoresis I: Background and Theory
Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 321-349 (1964)

3 Davis, B.J.
Disk Electrophoresis II· Method and Application to Human Serum Proteins
Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 404-427 (1964)

4 Morris, C.J.O.R. and Morris, P.
Separation Methods in Biochemistry p.639 ff
Verlag: Sir Isaak Pitman and Sons Ltd. London 1963

5 Maurer, H.R.
Disk Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Verlag: Walter de Gruyter Berlin, New York

6 Abraham, K. Dissertation in Vorbereitung

7 Abraham, I. Dissertation in Vorbereitung

8 Raymond, S. and Nakamichi, M.
Electrophoresis in Synthetic Gels I: Relation of Gel Structure to Resolution
Anal. Biochem. 3, 23-30 (1962)

9 Raymond, S. and Nakamichi, M.
Electrophoresis in Synthetic Gels II: Effect of Gel Concentration
Anal. Biochem. 7 (2), 225-232 (1964)

10 Kohlrausch, F.
zitiert bei (5)
Ann. Physik und Chemie 62, 209 (1897)

11 Raymond, S.
zitiert bei (5)
Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 350 (1964)

12 Williams, D.E. and Reisfeld, R.A.
Disk Electrophoresis in Polyacrylamide Gels: Extension to new Conditions of pH and Buffer
Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 373-381 (1964)

13 Clarke, J.T.
Simplified Disk (Polyacrylamide Gel) Electrophoresis
Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 428-436 (1964)

14 Hjerten, S., Jerstedt, S. and Teselius, A.
Some Aspects of the Continuous and Discontinuous Buffer Systems in Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Anal.Biochem. 11 (2) 219-223 (1965)

15 Jongkind, J.F., Wisse, J.H. and Bloemendal, H.
Protides Biol. Fluids Proc. 10th Coll.Brugge p.77
Edit.H.Peters; Verlag: Elsevier Publ.Co.
Amsterdam (1963)

16 Bloemendal, H.
Zone Electrophoresis in Blocks and Columns
Verlag: Elsevier Publ.Co. New York (1963)

17 Bloemendal, H., Jongkind, J.F. and Wisse, J.H.
Polyacrylamide: A new Stabilized Medium for Zone Electrophoresis
Chemisch Weekblad 59, 501-504 (1962)

18 Bloemendal, H.
Zone Electrophoresis: Application of some recent rapid Separation Methods
Chemisch Weekblad 59, 281-287 (1963)

19 Aronsson, T. and Grönwall, A.
Improved Separation of Serum Proteins in Paper Electrophoresis - A new Electrophoresis Buffer -
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 9, 338-341 (1957)

20 Hilgermann, R.
Optimal Preparation and Diagnosis of Gc-Types
Z.Klin.Chem.u.Biochem. 5 (6), 317-321 (1957)

21 Mogi, G.
Electrophoresis using Polyacrylamide Gel as a Supporting Medium II: Changes of Electrophoretic Patterns of Human Serums in Various Diseases by means of Disk Electrophoresis. Normal Adult Serum
Seibutsu-Butsuri Kagaku 11, 99-107 (1965)

22 Mogi, G.
Electrophoresis using Polyacrylamide Gel as a Supporting Medium III: Changes of Disk Electrophoresis Patterns of Human Serums in Various Diseases
Seibutsu-Butsuri Kagaku 11 (2), 99-107 (1965)

23 Pastewka, J.V., Ness, A.T. and Peacock, A.C.
Electrophoretic Patterns of Normal Human Serums by Disk Electrophoresis in Polyacrylamide Gels
Clin.Chim.Acta 14, 219-261 (1966)

24 Felgenhauer, K.
Quantitation and Specific Detection Methods after Disk Electrophoresis of Human Serum Patterns
Clin.Chim.Acta 27, 305-312 (1970)

25 Nyman, M.
Serum Haptoglobin
Scand.J.Clin.and Lab.Invest. 11, Suppl.No 39 (1959)

26 Conell, G.E., Dixon, G.H. and Smithies, O.
Subdivision of the three Common Haptoglobin Types based on 'Hidden' Differences
Nature 193, 505-506 (1962)

27 Parker, W.C. and Bearn, A.G.
Control Gene Mutation as a Possible Explanation of certain Haptoglobin Phenotypes
Amer.J.Hum.Genet. 15, 159 (1963)

28 Hoffmeister, H., Abraham, K., Müller, J. und Schütt,K.
Zur Quarternärstruktur der Haptoglobine in normalen und pathologischen Humanserenuntersuchungen mit der Kontinuierlichen Polyacrylamidelektrophorese
7th int.Congr.clin.Chem. Genf/Evian
Vol 1: Methods in Clinical Chemistry pp 152-162
Karger Verlag (1970)

29 James, K., Taylor, F.B. and Fudenberg, H.H.
Trypsin Stabilisors in Human Serum. The Role of alpha$_2$-Macroglobulin
Clin.Chim.Acta 13, 359-368 (1968)

30 Conell, G.E. and Smithies, O.
Human Haptoglobins: Estimation and Purification
Biochem.J. 72, 115 (1959)

31 Owen, J.A., Better, F.C. and Hoban, J.
A Simple Method for the Determination of Serum Haptoglobin
J.Clin.Pathol. 13, 163 (1960)

32 Allison, A.C. and Rees, W.A.
The Binding of Hemoglobin by Plasma Proteins (Haptoglobin); its Bearing on the Renal Threshold for Hemoglobin and the Aetiology of Hemoglobinuria
Brit.Med.J. 11, 1137 (1957)

33 Laurell, C.B. and Nyman, M.
Studies on the Serum Haptoglobin Level in Hemoglobinemia and it's Influence on Renal Excretion of Hemoglobin
Blood 12, 493 (1957)

34 Owen, J.A., Sibermann, H.J. and Got, C.
Detection of Hemoglobin-Haptoglobin Complexes and other Substances with Peroxidase Activity after Zone Electrophoresis
Nature 182, 1373 (1958)

35 Nyman, M.
Serum Haptoglobin: Methodological and Clinical Studies
Scand.J.Clin.and Lab.Invest. 11, Suppl.No. 39 (1959)

36 Brissaut, H.E.
Etude clinique de l'haptoglobine
Thèse Doct. Med. Paris (1940)

37 Wendt, G.G., Krüger, J. und Kindermann, J.
Serumgruppen und Krankheit
Human Genet. 6, 281 (1968)

38 Hamaguchi, H.
Purification and some Properties of the three Common Genetic Types of Haptoglobins and the Hemoglobin-Haptoglobin Complexes
The American Journ.of Human Genetic, 21 (5) 440-456 (1969)

39 Laurell, C.B.
Purification and Properties of Different Haptoglobins
Clin.Chim.Acta 4, 79-81 (1959)

40 Zingale, S.B., Mattioli, C.A., Bohner, H.D. and Bueno,M.P.
Disk Electrophoretic Study of Serum Proteins from Patients with Multiple Myeloma and Macroglobulinemia
Blood 22, 152-164 (1963)

41 Kochwa, S.,Smith, E., Davis, B.J. and Wasserman, L.R.
Abnormal Proteins and Protein Fractions in Myelome
Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 437-459 (1964)

42 Hammack, W.J., Moore, M. and Albert, B.
The Use of Gel Electrophoresis in the Diagnosis of the Paraproteinemias
Ann.N.Y.Sci. 121, 437-444

43 Scheurlen, P.G.
Differentialdiagnostische Bedeutung von Serumeiweißuntersuchungen
Internist 9 (2), 56-63 (1968)

44 Peacock, A.C.
Serum Haptoglobin Type and Leucemia: an association with possible ethiological significance
J.Nat.Cancer Inst. 36, 631 (1966)

45 Klein, H.
Haptoglobin: Grundlagen, Probleme, Erfahrungen
Deutsch.Zeitschr.f.d.ges.Gerichtl.Med. 51, 455-463 (1961)

46 Murray, R.K. and Conell, G.E.
Elevation of Serum Haptoglobin in Rabbits in Response to Experimental Inflamation
Nature 186, 86 (1960)

47 Robert, L., Mombelloni, P. and Crosti, P.
Studies on Serum Haptoglobin in Experimental Connective Tissue Disorders
Proc.Exptl.Biol.Med. 107, 499-502 (1961)

Verzeichnis der Abbildungen und Text der Legenden

S. 7 Abbildung 1

Berechnung der Eiweißmenge eines Peaks aus der Integratorkurve
U= Proteinuntergrund ; G=Gesamtpeak

S. 10 Abbildung 2

Modellversuch zum "Diskeffekt" von Nativserum
Dialysiertes und lyophyllisiertes Serum wurde in verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen.
——— aqua bidest.
---- Tris-Glycin Puffer ph 8,6
..... Tris-HCl Puffer ph 7,2

S. 11 Abbildung 3a (oben)

Gel mit einheitlicher Porengröße nach Bloemendal

S. 11 Abbildung 3b (unten)

Gleiches Serum wie in Abb.3a,getrennt in einem dichtem und weitem Anteil aufgebautem Gel

S. 13 Abbildung 4a (oben)

Genetisch bedingter Polymorphismus in Normalpherogrammen
Im Postalbuminbereich wurden die drei Gc-Typen und im Posttransferrinbereich die Haptoglobintypen Hp 2-1 und Hp 2-2 übereinanderprojiziert.

S. 13 Abbildung 4b (unten)

Haptoglobintyp Hp 1-1
Zur Verdeutlichung der Lage des Hp 1-1 Monomers wurde das Pherogramm eines pathologischen Serums herangezogen.

S. 16 Abbildung 5a und 5b (oben nebeneinander)

Abbildung 5a

Pherogramm eines hämolytischen Serums
Die Hämoglobinkonzentration liegt unterhalb der Bindungskapazität des Haptoglobins.

Abbildung 5b

Pherogramm eines hämolytischen Serums
Die Bindungskapazität des Haptoglobins ist überschritten,freies Hämoglobin tritt als gesonderte Fraktion auf.

S 16 Abbildung 6

Veränderungen im Pherogramm eines Normalserums, das in vitro mit Collagenase beladen wurde.

S. 17 Abbildung 7

Eichkurve für den Farbstoff Procion Brilliant Blau,rein mit dem Bezugsprotein Humantransferrin (Behring-Werke)

S. 22 Abbildung 8

Mittelwerte und Vertrauensbereiche für die drei ersten Polymere der Haptoglobintypen Hp2-1, und Hp2-2,das Hp1-1 Monomer und das Transferrin jewils in der Reihenfolge:Kollektiv der Blutspender - Kollektiv der entzündlichen Erkrankungen - Kollektiv der malignen Erkrankungen

S. 25 Abbildung 9

Verlaufsbeobachtung von drei typischen Fällen aus den Kollektiven :Normalwerte - Entzündungen-Karzinome

S. 26 Abbildung 10 (oben)

Plasmocytom mit M-Gradienten im IgA

S. 26 Abbildung 11 (unten)

Plasmocytom mit M-Gradienten im IgG

S. 27 Abbildung 12

Morbus Waldenström
M-Gradient im IgM

Verzeichnis der Tabellen und Text der Legenden

S. 9a Tabelle 1

Vorschrift zur Herstellung der Stammlösungen

S. 18 Tabelle 2

Vergleich der Standardabweichungen von von methodischem Fehler und biologischer Streuung

S. 18a Tabelle 3

Normalwerte, deren Standardabweichungen und Vertrauensbereiche für die wichtigsten Serumfraktionen

S. 20a Tabelle 4

Vergleich zwischem dem Kollektiv der entzündlichen Erkrankungen und den Normalwerten. F-Test : p = 0,05
t-Test : p = 0,01

S. 20b Tabelle 5

Vergleich zwischen den Kollektiven der Entzündungen und Bronchialkarzinome
Die Haptoglobintypen wurden getrennt ausgewertet. Die Indices a,b,c beziehen sich auf die Reihenfolge der sichtbaren Haptoglobin-Polymergipfel im Posttransferrinbereich.
F-Test : p = 0,05
t-Test : p = 0,01

Herrn Professor Dr H.Hoffmeister gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die gründliche Ausbildung in den Methoden der klinischen Chemie,die meinen Berufsweg bestimmt hat.
Herrn Professor Dr H.Busch,Leiter der Universitätsblutbank Hamburg und den Kollegen des LVA Krankenhauses Hamburg Großhansdorf danke ich für die zur Verfügung gestellten Seren.

Lebenslauf

Am 6.1.1943 wurde ich in Neumünster geboren.
Nach einer vierjährigen Grundschulzeit besuchte ich von 1953 bis 1957 die Holstenschule in Neumünster. Im Februar 1963 legte ich an der Immanuel-Kant-Schule in Neumünster die Reifeprüfung ab.
Von 1963 bis 1964 leistete ich ein Jahr Wehrdienst.
Im Sommersemester 1964 immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg und bestand am 7.8.1970 die ärztliche Prüfung. Nach einjähriger Medizinalassistentenzeit erhielt ich am 4.10.1971 die Approbation.
Danach folgte eine einjährige Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am klinisch-chemischen Laboratorium des Instituts für Sozialmedizin und Epidemiologie.
Seit August 1972 bin ich als Assistenzarzt am Bakteriologisch-Serologischen Institut des Städtischen Krankenhauses Moabit tätig.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198